

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-163368

(43) 公開日 平成7年(1995)6月27日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所	
C12N 15/09	ZNA	9281-4B	C12N 15/00	ZNA	A
5/10		7729-4B	5/00		B

審査請求 未請求 請求項の数13 FD (全15頁)

(21) 出願番号 特願平5-342237

(22) 出願日 平成5年(1993)12月15日

(71) 出願人 000155908

株式会社林原生物化学研究所
岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72) 発明者 森 哲也

京都府京都市上京区寺町通り今出川上る2
丁目鶴山町1番地の12アビタシオン倶楽
堂ビル413号

(72) 発明者 山本 康三

岡山県岡山市倉田658番地27

(72) 発明者 太田 恒孝

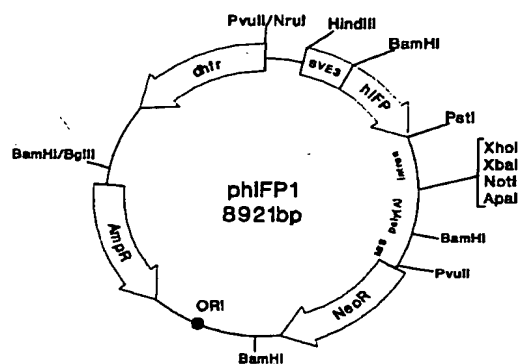
岡山県岡山市平井3丁目1015番48号

(54) 【発明の名称】 組換えDNAとその組換えDNAを含む形質転換体

(57) 【要約】

【目的】 有用ポリペプチドをコードするDNAの発現を人為的に制御できる複製可能な組換えDNAとその組換えDNAを哺乳動物由来の宿主細胞に導入してなる形質転換体を提供することにある。

【構成】 IFN- α プロモータを連結したプラスミドベクターと、IFN- α 以外のポリペプチドをコードするDNAとを含んでなる複製可能な組換えDNAと、その組換えDNAを哺乳動物由来の宿主細胞に導入してなる形質転換体を構成とする。



1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インターフェロン- α プロモータを連結したプラスミドベクターと、インターフェロン- α 以外のポリペプチドをコードするDNAとを含んでなる複製可能な組換えDNA。

【請求項2】 インターフェロン- α プロモータがヒト

インターフェロン- α プロモータである請求項1に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項3】 インターフェロン- α プロモータが下記
の化1に示す塩基配列を有する請求項1又は2に記載の複製可能な組換えDNA。

【化1】

CGCCTCTTAT	GTACCCACAA	AAATCTATTT
TCAAAAAAGT	TGCTCTAAGA	ATATAGTTAT
CAAGTTAAGT	AAAATGTCAA	TAGCCTTTTA
ATTTAATTTT	TAATTGTTTT	ATCATTCTTT
GCAATAATAA	AACATTAAC	TTATACTTTT
TAATTTAATG	TATAGAAATAG	AGATATACAT
AGGATATGTA	AATAGATACA	CAGTGTATAT
GTGATTAAAA	TATAATGGGA	GATTCAAATCA
GAAAAAAGTT	TCTAAAAAGG	CTCTGGGGTA
AAAGAGGAAG	GAAACAATAA	TGAAAAAAAT
GTGGTGAGAA	AAACAGCTGA	AAACCCATCT
AAAGAGTGCA	TAAAGAAAGC	AAAAAGAGAA
GTAGAAAGTA	ACACAGGGGC	ATTTGGAAAA
TGTAAACGAG	TATGTTCCCT	ATTTAAGGCT
AGGCACAAAG	CAAGGTCTTC	AGAGAACCCTG
GAGCCTAAGG	TTTAGGCTCA	CCCATTTCAA
CCAGTC		

【請求項4】 プラスミドベクターがG-418耐性遺伝子、メトトレキセート耐性遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子からなる群より選ばれる2種以上の薬剤耐性遺伝子を連結する請求項1、2又は3に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項5】 プラスミドベクターがpHIFP1である請求項1、2、3又は4に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項6】 DNAがヒトエリスロポエチン又はヒトインターフェロン- γ をコードする請求項1、2、3、4又は5に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項7】 請求項1の組換えDNAを哺乳動物由来の宿主細胞に導入してなる形質転換体。

【請求項8】 インターフェロン- α プロモータがヒトインターフェロン- α プロモータである請求項7に記載の形質転換体。

【請求項9】 インターフェロン- α プロモータが化1に示す塩基配列を有する請求項7又は8に記載の形質転換体。

【請求項10】 プラスミドベクターがG-418耐性遺伝子、メトトレキセート耐性遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子からなる群より選ばれる2種以上の薬剤耐性遺伝子を連結する請求項7、8又は9に記載の形質転換体。

【請求項11】 組換えDNAにおけるプラスミドベクターがpHIFP1である請求項7、8、9又は10に

記載の形質転換体。

【請求項12】 DNAがヒトエリスロポエチン又はヒトインターフェロン- γ をコードする請求項7、8、9、10又は11に記載の形質転換体。

【請求項13】 宿主細胞がヒトリンパ球様細胞である請求項7、8、9、10、11又は12に記載の形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の利用分野】 この発明は、新規な組換えDNAとそれを含む形質転換体に関するものであり、詳細には、有用ポリペプチドの発現を人為的に制御し得る組換えDNAと、その組換えDNAを哺乳動物由来の宿主細胞に導入してなる形質転換体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 組換えDNA技術における近年の発達には目覚ましいものがある。今日では、生体内にごく微量存在するポリペプチドであっても、組換えDNA技術を応用することにより、比較的容易に所望量を製造できるようになってきた。インシュリンやインターフェロン（以下、「IFN」と略記する。）はその典型であり、現在、それ以外にも多種多様の組換え型ポリペプチドが医薬品として実用化されていたり臨床試験されている。

【0003】 組換え型ポリペプチドは、通常、ポリペプチドをコードするDNAを大腸菌などの宿主微生物に導入して形質転換体となし、この形質転換体を培養し、その培養物を精製して製造される。この方法は、組換えDNAを入念に構築することにより、比較的容易に高効率の形質転換体が得られる利点があるものの、微生物がポリペプチドをグリコシレートする能力を本来的に欠失していることから、糖鎖を有するポリペプチドは製造できないという欠点がある。ここ数年間の研究により、ある種のリンホカインやサイトカインにおいては、糖鎖の有無がその薬効や副作用に重大な影響を及ぼし得ることが判ってきた。微生物とは違って、哺乳動物由来の宿主細胞ではグリコシレーションが生理的に起こることから、最近、斯界においては微生物に代わる宿主としてヒトを始めとする哺乳動物由来の細胞が見直されつつある。

【0004】 ところで、宿主に導入したDNAを効率良く発現させるには、DNAに強力なプロモータを連結する必要がある。これまでに多種多様のプロモータが考案されてきており、これらは構成的に発現するものと、外部刺激により誘導的に発現するものとに大別することができる。一般に、形質転換体においては、宿主に依って、発現したポリペプチドにより障害を起こし、結果的にDNAの発現効率が低下したり、場合に依っては、全く発現しなかったり、宿主が死滅することすらある。このことから、DNAの発現を外部刺激により制御できる後者のプロモータを使用するのが望ましい。

【0005】 外部刺激により誘導的に発現するプロモ-

タとしては、マウス乳腺腫瘍ウイルスプロモータ、メタロチオネインプロモータ、熱ショック蛋白質プロモータなどが知られている。これらプロモータはDNAの発現を人為的に制御可能ならしめる点で優れているが、全般的に発現能力が低いうえに、ステロイドホルモン、重金属、加熱などによる外部刺激を必要とするという問題がある。ステロイドホルモンや重金属は生体内においてそれぞれ独特の生物作用や毒性を示すことが多く、ヒトへの投与を前提とする組換え型ポリペプチドの製造には使い辛い。加熱による発現誘導は斯かる物質を製造系に加えない点で優れているが、熱ショック蛋白質プロモータの研究は端緒についたばかりであり、未だ、必要にして十分な発現能力を持つプロモータすら開発されていないのが現状である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 斯かる状況に鑑み、この発明の目的は、有用ポリペプチドをコードするDNAの発現を人為的に制御できる複製可能な組換えDNAを提供することにある。

【0007】 この発明のさらに別の目的は、この組換えDNAを哺乳動物由来の宿主細胞に導入してなる形質転換体を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】 この発明は、前記第一の課題を、インターフェロン- α プロモータ（以下、「IFN- α プロモータ」と略記する。）を連結したプラスミドベクターと、インターフェロン- α （以下、「IFN- α 」と略記する。）以外のポリペプチドをコードするDNAとを含んでなる複製可能な組換えDNAにより解決するものである。

【0009】 この発明は、前記第二の課題を、上記複製可能な組換えDNAを哺乳動物由来の宿主細胞に導入してなる形質転換体により解決するものである。

【0010】

【作用】 この発明の組換えDNAは、哺乳動物由来の適宜宿主細胞に導入して形質転換体とし、その形質転換体をIFN- α 誘導剤で刺激しながら培養すると、所期のポリペプチドを発現する。

【0011】 この発明による形質転換体は、IFN- α 誘導剤で刺激しながら培養すると、所期のポリペプチドを産生する。

【0012】 以下、実験例、実施例などにに基づきこの発明を説明するに、この発明の組換えDNAはIFN- α プロモータを連結したプラスミドベクターと、IFN- α 以外のポリペプチドをコードするDNAとを含んでなるものである。

【0013】 IFN- α プロモータとは、本来、哺乳動物の細胞にあって、IFN- α をコードするDNAの発現をプロモートするDNAを意味している。これまでに、起源の相違する幾つかのIFN- α プロモータが知

5

られており、例えば、ヒト由来のIFN- α プロモータ（以下、「HuIFN- α プロモータ」と略記する。）には、HuIFN- α 2プロモータやHuIFN- α 8プロモータを始めとする20種類前後のプロモータが存在する。マウスやラットなどの動物にも類似のプロモータが存在し、これらはこの発明においてHuIFN- α プロモータと同様に使用可能ではあるが、医薬品に配合

6

してヒトに投与することを前提とするポリペプチドを製造する場合には、本来、ヒトの体内に存在するHuIFN- α プロモータを使用するのが望ましい。下記の化2に、HuIFN- α 2プロモータ（以下、「hIFP」と略記する。）の5'末端よりの塩基配列を示す。

【0014】

【化2】

10	20	30
CGCCTCTTAT	GTACCCACAA	AAATCTATTT
40	50	60
TCAAAAAAGT	TGCTCTAAGA	ATATAGTTAT
70	80	90
CAAGTTAAGT	AAAATGTCAA	TAGCCTTTTA
100	110	120
ATTTAATTTT	TAATTGTTTT	ATCATTCTTT
130	140	150
GCAATAATAA	AACATTAACT	TTATACTTTT
160	170	180
TAATTTAATG	TATAGAAATAG	AGATATACAT
190	200	210
AGGATATGTA	AATAGATACA	CAGTGATATAT
220	230	240
GTGATTAAAA	TATAATGGGA	GATTCAATCA
250	260	270
GAAAAAAGTT	TCTAAAAAGG	CTCTGGGGTA
280	290	300
AAAGAGGAAG	GAAACAATAA	TGAAAAAAAT
310	320	330
GTGGTGAGAA	AAACAGCTGA	AAACCCATGT
340	350	360
AAAGAGTGCA	TAAAGAAAGC	AAAAAGAGAA
370	380	390
GTAGAAAGTA	ACACAGGGGC	ATTTGGAAAA
400	410	420
TGTAACGAG	TATGTTCCCT	ATTTAAGGCT
430	440	450
AGGCACAAAG	CAAGGTCTTC	AGAGAACCTG
460	470	480
GAGCCTAAGG	TTTAGGCTCA	CCCATTTCAA
486		
CCAGTC		

【0015】IFN- α プロモータは、斯界における通常一般の方法により、哺乳動物の細胞から得ることができる。例えば、白血球やリンパ芽球様細胞などのIFN- α 産生細胞からゲノムDNAを採取し、精製後、PCR法によりIFN- α プロモータ領域を含む塩基配列のプライマーの存在下で遺伝子増幅する。そして、得られたDNA断片を適宜ベクターに挿入して組換えDNAとなし、大腸菌などの適宜宿主内で増殖させ、培養物から組換えDNAを採取する。この組換えDNAを適宜制限酵素で切断すれば、IFN- α プロモータ領域を含むDNA断片が得られる。この発明で使用するプラスミドベクターは斯かるIFN- α プロモータを連結してなるも

のであり、通常、制限酵素とDNAリガーゼを併用して前述のようなDNA断片をIFN- α 以外のポリペプチドをコードするDNAや薬剤耐性遺伝子などと適宜連結することにより人為的に創製される。

【0016】この発明で用いるプラスミドベクターは、組換えDNAや形質転換体をクローニングするための適宜薬剤耐性遺伝子や、形質転換体の発現効率を高めるための適宜エンハンサーの挿入を妨げない。個々の薬剤耐性遺伝子としては、例えば、蛋白質合成阻害剤の一種であるG-418への耐性を与えるネオマイシン・アミノグリコシド・フォスホトランスフェラーゼ遺伝子（以下、「NeoR遺伝子」と略記する。）、核酸合成阻害

剤の一種であるメトトレキセートへの耐性を与えるジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子（以下、「dhfr 遺伝子」と略記する。）、アンピシリンへの耐性を与えるβ-ラクタマーゼ遺伝子（以下、「Amp^R」と略記する。）などが挙げられる。エンハンサーにはSV40エンハンサー（以下、「SVE」と略記する。）が好適であり、前記プラスミドベクターp h I F P 1はこれら薬剤耐性形質やエンハンサーをすべて具備しており、この発明を実施するうえで極めて有用である。なお、プラスミドベクターの適所に開始コドンや終止コドンを適宜挿入し得ることは言うまでもない。

【0017】次に、プラスミドベクターに挿入されるIFN-α以外のポリペプチドをコードするDNAについて説明するに、この発明でいうポリペプチドとはIFN-α以外のポリペプチド一般を意味し、分子中における糖鎖の有無がその生物作用や副作用に実質的な影響をもたらすものも対象となり得る。個々のポリペプチドとしては、IFN-β、IFN-γ、腫瘍壊死因子、マクロファージ遊走阻止因子、マクロファージ活性化因子、マクロファージ走化性因子、コロニー形成因子、幼若化因子、インターロイキン2、インターロイキン3、好中球走化性因子及び白血球遊走阻止因子などのサイトカイン、エリスロポエチン、インシュリン、ソマトスタチン、成長ホルモンなどのポリペプチド、さらには、組織プラスミノゲン・アクチベータなどの酵素がその対象となる。このうちの多くのポリペプチドは、本来、糖鎖を結合した形態で産生されており、その一部においては、糖鎖の有無がその生物作用や副作用に実質的な影響を及ぼすことが知られている。この発明の形質転換体が産生するHuIFN-γ、腫瘍壊死因子、ヒトエリスロポエチン（以下、「hEPO」と略記する。）などには有意の糖鎖が結合しており、医薬品に配合してヒトに投与すると、重篤な副作用を惹起することなく顕著な治療・予防効果を発揮する。

【0018】この発明でいうポリペプチドは、上記のごときものである。したがって、この発明でいうIFN-α以外のポリペプチドをコードするDNAとは斯かるポリペプチド又はその相同変異体をコードするDNA若しくはDNA断片ということになり、通常、cDNAの形態で使用される。cDNAは一般に所望量入手するのが容易であり、且つ、特別な前処理をすることなくプラスミドベクターに挿入できる利点がある。斯かるcDNAを制限酵素とDNAリガーゼを併用してプラスミドベクターに挿入すれば、この発明による組換えDNAが得られる。この発明による組換えDNAは複製可能であり、大腸菌などの微生物を利用して増殖させることにより、容易に所望量を得ることができる。

【0019】この発明の形質転換体は、前記で説明したような組換えDNAを哺乳動物由来の宿主細胞に導入してなるものである。宿主細胞には通常一般のものが使用

でき、この発明による組換えDNAを導入でき、且つ、得られる形質転換体が外部刺激に応じて所期のポリペプチドを産生するかぎり、宿主細胞の出所・由来を限定しない。一般的な宿主細胞としては、例えば、血球細胞胚幹細胞、リンパ球、線維芽細胞、卵母細胞及びそれらの変異細胞などがあり、目的とするポリペプチドと使用する組換えDNAの性質・性状等を勘案して適宜選択すればよい。ただし、ポリペプチドの用途に依っては宿主細胞の由来を限定せざるを得ないことがあり、例えば、医薬品に配合してヒトに投与することを前提にするポリペプチドの場合には、ヒト由来の宿主細胞を使うのが望ましい。個々の宿主細胞としては、例えば、チャイニーズ・ハムスター由来のCHO細胞(ATCC CCL61)、急性リンパ芽球性白血病由来のBALL-1細胞(JCRB003578)やバーキットリンパ腫由来のナマルノ細胞(ATCC CRL1432)が挙げられ、このうち、BALL-1細胞を始めとするリンパ芽球様細胞は高発現効率の形質転換体が容易に得られ、増殖も容易なことから、大量の有用ポリペプチドを製造するのに最適な宿主である。これら宿主細胞にこの発明による組換えDNAを導入するには、例えば、DEAE-デキストラン法、燐酸カルシウム共沈澱法、エレクトロポレーション、リポフェクション、大腸菌とのプラトプラスト融合、マイクロインジェクション、感染性ウイルスベクターなど斯界における通常一般の方法が採用できる。

【0020】次に、この発明による形質転換体の使用方法について説明するに、所望するポリペプチドの量にも依るが、当該形質転換体を使ってポリペプチドを製造するには、先ず、形質転換体を増殖させて必要量の形質転換体を取得し、次に、増殖した形質転換体をIFN-α誘導剤で刺激しながら培養してポリペプチドを産生させる。

【0021】この発明による形質転換体は、斯界における通常一般の方法により増殖させることができる。例えば、培養培地に形質転換体を細胞密度約 1×10^4 乃至 1×10^6 個/mlになるように浮遊させ、必要に応じて培養培地を新鮮なものと取換えながら、通常一般の方法により37℃前後で約1日乃至1週間培養すると、形質転換体が約2乃至200倍に増殖する。リンパ芽球様細胞を宿主とする形質転換体の増殖は遥かに容易であり、例えば、必要に応じてウサギ由来の抗胸腺抗体を注射して免疫反応を減弱させておいたマウス、ヌードマウス、ヌードラット、ハムスターなどの嚙歯類の新生児に形質転換体を動物1匹当たり約 1×10^4 乃至 1×10^6 個皮下或は腹腔内などに移植する。そして、動物を通常一般の方法により約2乃至10週間飼育すると、体内に形質転換体により腫瘍塊が生じる。この腫瘍塊を採取し、適宜分散媒中で分散・洗浄後ポリペプチドの製造に供する。このようにして形質転換体をヒト以外の温血動

物を利用して生体内で増殖させるときには、約2乃至10,000倍の形質転換体を容易に取得することができる。なお、ヒト以外の温血動物を利用する増殖方法は、特公昭56-54158号公報に詳述されている。

【0022】このようにして得られた形質転換体は、IFN- α 誘導剤で刺激しながら培養すると、細胞内外にポリペプチドを産生する。IFN- α 誘導剤については特に限定がなく、通常、センダイウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ワクシニアウイルスなどのウイルスや二本鎖RNAなどが使用される。ポリペプチドにも依るが、斯かる誘導剤の存在下で、通常、約35乃至37℃で約10乃至20時間培養すると、形質転換体内外にポリペプチドが産生する。このとき、適量のIFN- α をIFN- α 誘導剤と同時若しくは逐次作用させると、形質転換体によるポリペプチドの産生量が著増することがある。ポリペプチドや宿主細胞の種類にも依るが、培養培地に加えるIFN- α 誘導剤の量は、通常、ウイルス性誘導剤で約0.1乃至50,000赤血球凝集単位/ml、望ましくは、約10乃至500赤血球凝集単位/ml、二本鎖RNAで約1乃至100 μ g/ml、望ましくは、約10乃至50 μ g/mlの範囲にある。IFN- α 誘導剤と併用するIFN- α の量は、通常、約0.1乃至10,000IU/ml、望ましくは、約100乃至1,000IU/mlの範囲にある。IFN- α の量がこれより少ないと効果が現われ難く、一方、この範囲を上回ると、後の精製に影響を及ぼすことがある。このことから、上記範囲をもって最良とした。

【0023】産生したポリペプチドは、斯界における通常一般の方法で精製することができる。例えば、遠心分離により培養物から形質転換体を除去して得られる培養上清に硫酸アンモニウムを加えて塩析し、得られる粗ポリペプチドを含む沈殿物を、例えば、濃縮、塩析、透析、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、電気泳動、等電点電気泳動、アフィニティークロマトグラフィーなどの精製方法を適宜組合せて精製すればよい。ポリペプチドがIFNや腫瘍壊死因子の場合には、モノクローナル抗体をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーが有用であり、最高純度のポリペプチドを最少限の労力とコストで得ることができる。

【0024】斯くして得られたポリペプチドには、宿主内におけるDNA発現後の修飾により有意の糖鎖が付加されている。このことから、この発明は組換えDNA技術により、天然型ポリペプチドにより近い性質・性状のポリペプチドを与えるものといえる。

【0025】以下、2~3の実施例に基づき、この発明による組換えDNA及び形質転換体を具体的に説明する。なお、以下の実施例で用いた手法自体は斯界における普通一般のものであり、例えば、サンプブルック等『モレキュラー・クロニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、第2版、1989年、コールド・スプリング・

ハーバー社発行やアウスベル等『カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー』、1990年、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社発行などにも詳述されている。

【0026】

【実施例1 hEPOをコードするDNAを含む組換えDNA】本例では、IFN- α 以外のポリペプチドとしてhEPOをコードするDNAを含む組換えDNAの1例を示す。本例の組換えDNAは、hEPOをコードするcDNAをプラスミドベクターpHIFP1に挿入して創製したものであり、ヒトリンパ芽球様細胞を始めとする哺乳動物由来の宿主細胞に容易に導入でき、外部刺激に応答して高い発現効率を発揮するものである。

【0027】

【実施例1-1 プラスミドベクターpHIFP1の調製】プラスミドベクターpHIFP1は、hIFP領域を含む508塩基対からなるBamHI-PstI DNA断片、ヒト β -グロビンイントロン領域を含む840塩基対からなるPstI-XhoI DNA断片、SV40ウイルス由来のポリアデニル化シグナル領域（以下、「poly(A)領域」と略記する。）を含む320塩基対からなるXhoI-BamHI DNA断片、M13ファージの複製開始点（以下、「M13」と略記する。）含む467塩基対からなるBamHI-PvuII DNA断片、NeoR遺伝子を含む1,487塩基対からなるPvuII-BamHI DNA断片、大腸菌における複製開始点（以下、「ORI」と略記する。）とAmpR遺伝子を含む2,230塩基対からなるBamHI-BglII DNA断片、dhfr遺伝子を含む1,907塩基対からなるBamHI-PvuII DNA断片、277塩基対からなるNruI-NdeI DNA断片、214塩基対からなるNdeI-HindIII DNA断片及びSVE遺伝子が3個直列に連結した684塩基対からなるHindIII-BamHI DNA断片をこの順序で連結して創製したものである。図1にプラスミドベクターpHIFP1の構造を示す。以下、これらDNA断片の調製例について説明する。

【0028】

【実施例1-1(a) hIFP領域を含むDNA断片の調製】常法により増殖させたBAL-1細胞を約 1×10^8 個とり、冷PBSで洗浄後、冷TNE₁₀₀中、穏やかに攪拌しながらプロテイナーゼK及びSDSを作用させた。反応物を50℃で15時間インキュベートした後、フェノール/クロロホルム混液で洗浄し、TE液に対して透析後、透析内液にリボヌクレアーゼを適量加え、37℃で30分間インキュベートした。その後、適量のSDSとプロテイナーゼKを加え、37℃でさらに3時間インキュベートし、フェノール/クロロホルム混液で洗浄し、n-ブタノールで濃縮後、TE液に対して

透析して精製ゲノムDNAを得た。

【0029】別途、常法により、化2に示すhIFP遺伝子を含む塩基配列の下記表1又は表2に示すプライマー1及びプライマー2を化学合成し、これらプライマーの存在下で精製ゲノムDNAをPCR法により遺伝子増幅することにより、hIFP領域を含む約500塩基対からなるDNA断片を得た。常法により、このDNA断片にT4 DNAポリメラーゼを作用させて両末端を平滑化した後、T4 DNAリガーゼにより、予め制限酵素HincIIで処理しておいたプラスミドベクターpUC18 (ATCC 37253) に挿入した。得られた組換えDNAをコンピテントセル法により大腸菌HB101株 (ATCC 33694) に導入し、その後、

プライマー1:

5'-GGATCCCGCCTCTTATGTACCCACAAAAATC-3'

【0031】

プライマー2:

5'-GACGTCAGACTGGTTGAAATGGGTGAGCCTA-3'

【0032】

【実施例1-1 (b) ヒトβ-グロビンイントロン領域を含むDNA断片の調製】エス・エル・セイン等が『プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エー』、第87巻、第3924~3928頁 (1990年) に報告しているヒトβ-グロビンイントロンの塩基配列に基づき、そのB領域を挟みこむ下記の表3又は表4に示す塩基配列のプライマー3及びプライマー4を化学合成した。次いで、実施例1-1 (a) で得たBALL-1細胞由来の精製ゲノムDNAの一部をとり、これをプライマー3及びプライマー4を用いた以外は実験例1-1 (a) と同様に遺伝子増幅してヒトβ-グロビンイントロン領域を含む約850塩基対のDNA断片を得た。常法により、DNA断片の両末端をT4 DNAポリメラーゼで平滑化した後、T4 DNAリガーゼにより、予め制限酵素HincIIで切断しておいたストラタジーン・クロニング・システム社製プラスミドベクター『pB1

プライマー4:

5'-AGCTGTGGGAGGAAGATAAGAGG-3'

【0035】

【実施例1-1 (c) poly (A) 遺伝子を含むDNA断片の調製】プラスミドベクターpSV2neo (ATCC 37149) を制限酵素Bgl IIで消化し、T4 DNAリガーゼにより下記の表5に示す塩基配列のBgl IIリンカーを連結後、制限酵素Ba

大腸菌をアンピシリン100μg/mlを含むLB培地 (pH7.2) に植菌し、37℃で18時間培養後、培養物を遠心分離して菌体を採取し、通常一般方法により組換えDNAを抽出した。組換えDNAの一部をとり、挿入されたDNA断片の塩基配列をジデオキシ法により調べたところ、化2に示す塩基配列を含んでいた。その後、組換えDNAを制限酵素BamHI及びPstIで消化し、精製することにより、hIFP領域を含む508個の塩基対からなるBamHI-PstI DNA断片を得た。

【0030】

【表1】

【表2】

uescript SK (-) に挿入して組換えDNAとなし、これを実験例1-1 (a) と同様にして大腸菌HB101株に導入し、増殖させた後、分離・精製した。組換えDNAの一部をとり、挿入したDNA断片の塩基配列をジデオキシ法により分析したところ、セイン等が報告している塩基配列を含んでいた。その後、組換えDNAを制限酵素PstI及びXhoIで消化し、精製することにより、ヒトβ-グロビンイントロン領域を含む840塩基対からなるPstI-XhoI DNA断片を得た。

【0033】

【表3】

プライマー3:

5'-GGGTGAGTCTATGGGACCCCTTG-3'

【0034】

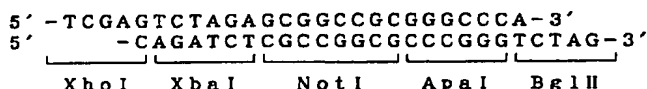
【表4】

mHIで消化し、精製することにより、poly (A) 遺伝子を含む320塩基対からなるXhoI-BamHI DNA断片を得た。

【0036】

【表5】

BglIIリンカー:



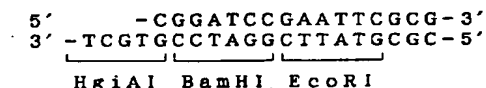
【0037】

【実施例1-1(d) M13を含むDNA断片の調製】常法により、宝酒造製ファージベクター『M13mp18』から調製したHgiAI-PvuII DNA断片にT4 DNAリガーゼにより下記の表6に示す塩基配列のHgiAIリンカーを連結後、制限酵素BamHIで消化し、精製することにより、M13を含む467塩基対からなるBamHI-PvuIIDNA断片を得た。

【0038】

【表6】

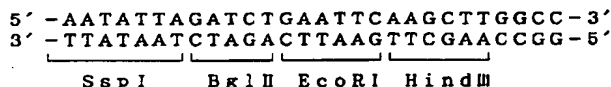
HgiAIリンカー:



【0039】

【実施例1-1(e) NeoR遺伝子を含むDNA断片

SspIリンカー:



【0042】

【実施例1-1(g) dhfr遺伝子を含むDNA断片の調製】常法により、プラスミドベクターpSV2-dhfr(ATCC 37146)を制限酵素BamHI及びPvuIIで消化し、精製することにより、dhfr遺伝子を含む1,907塩基対からなるBamHI-PvuII DNA断片を得た。

【0043】

【実施例1-1(h) NruI-NdeI DNA断片の調製】マイケル・ボシャート等が『セル』、第41巻、第521~530頁(1985年)に報告しているヒトサイトメガロウイルス(HCMV)エンハンサーの塩基配列に基づき、下記の表8又は表9に示す塩基配列のプライマー5及びプライマー6を化学合成した。

【0044】

【表8】

プライマー5:



【0045】

【表9】

【片の調製】常法により、プラスミドベクターpSV2neoを制限酵素PvuII及びBamHIで消化し、精製することにより、NeoR遺伝子を含む1,487塩基対からなるPvuII-BamHI DNA断片を得た。

【0040】

【実施例1-1(f) ORIとAmpR遺伝子を含むDNA断片の調製】常法により、プラスミドベクターpUC9(ATCC 37252)を制限酵素BamHI及びSspIで消化して得られるBamHI-SspI DNA断片にT4 DNAリガーゼにより下記の表7に示す塩基配列のSspIリンカーを連結後、制限酵素BglIIで消化し、精製することにより、ORIとAmpR遺伝子を含む2,230塩基対からなるBamHI-BglIIDNA断片を得た。

【0041】

【表7】

プライマー6:



【0046】別途、常法により、HCMV AD-169株(ATCC VR-807)のDNAを採取・精製し、プライマー5及びプライマー6の存在下でPCR法により遺伝子増幅し、得られた約280塩基対からなるDNA断片の両末端をT4 DNAポリメラーゼで平滑化した後、T4 DNAリガーゼにより、予め制限酵素HincIIで切断しておいたプラスミドベクターpUC18(ATCC 37253)に挿入した。得られた組換えDNAを実験例1-1(a)と同様にして大腸菌HB101株に導入し、増殖させた後、精製・採取し、制限酵素NruI及びNdeIで消化し、精製することにより、HCMV遺伝子を含む277塩基対からなるNruI-NdeI DNA断片を得た。

【0047】

【実施例1-1(i) NdeI-HindIII DNA断片の調製】常法により、プラスミドベクターpUC18を制限酵素NdeI及びHindIIIで消化し、精製することにより、214塩基対からなるNdeI-HindIIIDNA断片を得た。

【0048】

【実施例1-1(j) SVE遺伝子を含むDNA断片の調製】常法により、SV40 A2895株(ATCC VR-305)を増殖させ、DNAを採取・精製した。別途、ザルツマン等が『ザ・パボーバビリデス』、1986年、プレナム・プレス社発行、第27~98頁に報告している塩基配列に基づき、SVE領域を挟み込む下記の表10及び表11に示す塩基配列のプライマー7及びプライマー8を化学合成した。これらプライマー7及びプライマー8の存在下でSV40の精製DNAをPCR法により遺伝子増幅し、得られた約190塩基対からなるDNA断片の両末端をT4 DNAポリメラーゼで平滑化した後、T4 DNAリガーゼにより、予め制限酵素HincIIで切断しておいたプラスミドベクターpUC18に挿入して組換えDNAとなし、これを大腸菌HB101株に導入し、増殖させた後、採取・精製し、SVE領域をコードする配向方向の相違する2種類のプラスミドベクター『pHSVEB』及び『pHSVBE』を得た。これらプラスミドベクターの一部をとり、挿入されたDNA断片の塩基配列をジデオキシ法により調べたところ、ザルツマン等が報告している塩基配列を含んでいた。

【0049】

【表10】

プライマー7:

5'-CTATGGTTGCTGACTAATTGAG-3'

【0050】

【表11】

プライマー8:

5'-CTGAGGCGGAAAGAACCAGC-3'

【0051】その後、上記2種類の組換えDNAをそれぞれ制限酵素BamHI及びHindIIIで消化し、精製した後、T4 DNAリガーゼにより、予めHindIIIで切断しておいたプラスミドベクターpUC18に挿入した。得られたSV40エンハンサーが2個直列に連結した組換えDNAを制限酵素HindIIIで消化し、T4リガーゼにより、予め制限酵素HindIIIで切断しておいたプラスミドベクターpHSVEBに挿入して組換えDNAとなし、これを大腸菌HB101株に導入し、増殖させた後、採取・精製し、制限酵素HindIII及びBamHIで不完全消化し、精製することにより、SVEが3個直列に連結した684塩基対からなるHindIII-BamHI DNA断片を得た。

【0052】

【実施例1-2 hEPOをコードするDNAを含む組換えDNAの調製】常法により、ヒト腎癌細胞ACHN株(ATCC CRL1611)を増殖させ、増殖細胞

からmRNAを採取・精製した。別途、ケネス・ジェーコブス等が『ネーチャー』、第313巻、第806~810頁(1985年)に報告しているhEPOの塩基配列に基づき、hEPOをコードするcDNA領域を挟み込む下記の表12又は表13に示す塩基配列のプライマー9及びプライマー10を化学合成し、これらプライマーの存在下で精製mRNAをRT-PCR法により遺伝子増幅することにより、約600塩基対からなるcDNAを得た。cDNAの両末端をT4 DNAポリメラーゼで平滑化した後、T4 DNAリガーゼにより、予め制限酵素SmaIで切断しておいたプラスミドベクターpBluescript SK(-)に挿入して組換えDNAとなし、これをコンピテントセル法により大腸菌HB101株に導入し、増殖させた後、採取・精製した。組換えDNAの一部をとり、挿入したDNA断片の塩基配列をジデオキシ法により調べたところ、ジェーコブス等が報告している塩基配列を含んでいた。

【0053】

【表12】

プライマー9:

5'-GCGGAGATGGGGGTGCACGA-3'

【0054】

【表13】

プライマー10:

5'-CACCTGGTCATCTGTCCCTG-3'

【0055】上記で得た組換えDNAを常法により制限酵素XhoI及びNotIで消化し、消化物から採取・精製したhEPOをコードするcDNAを含むDNA断片を実施例1-1で調製したpHIFP1におけるHuIFN- α 2プロモータ下流のXhoI-NotI認識部位に挿入した。このようにして得られた組換えDNAを『pIFPhEPO』と命名した。

【0056】

【実施例2 hEPOをコードするDNAを含む形質転換体の調製】バイラド社製エレクトロポレーション装置『ジーン・バルサー』を使用し、実施例1-2で調製した組換えDNA『pIFPhEPO』を25 μ F、450ボルトの条件でBALL-1細胞に導入した。細胞を5%CO₂インキュベータ中、37°Cで72時間培養した後、10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したG-418 1mg/mlを含むRPMI1640培地(pH7.2)に細胞密度約4 \times 10⁵個/mlになるように浮遊させ、5%CO₂インキュベータ中、37°Cで約1カ月間培養後、生育細胞を採取・クローン化した。

【0057】得られた形質転換体を10%(v/v)仔ウシ血清を補足したRPMI1640培地(pH7.2)に細胞密度約4 \times 10⁵個/mlになるように浮遊させ、培養培地に株式会社林原生物化学研究所製IFN

α (BALL-1) を100 IU/mlを加え、37℃で3時間インキュベートした後、培養培地にセンダイウイルスを50 HA/ml加え、同じ温度でさらに15時間培養した。

【0058】得られた培養物のhEPO活性を測定したところ、発現が最も高い形質転換体BE-912で形質転換体 4×10^5 個当たり、約30 UのhEPO産生が認められた。対照として、同じ形質転換体をセンダイウイルスの非存在下で同様に培養したところ、hEPO産生は認められなかった。このことは、本例の形質転換体が、IFN- α 誘導剤による外部刺激により、その発現を人為的に制御可能であることを裏付けている。

【0059】なお、この発明を通じて、hEPO活性は、ゲラルド・クリスタルが『エクスperimental・ヘマトロジー』、第11巻、第7号、第649～660頁(1983年)に報告しているフェニルヒドラジンを投与して貧血を誘導したマウスの脾臓細胞における³H-チミジン取り込み量を指標とする方法に準じて測定し、国際単位(U)に較正して表示した。標準物質には、和光純薬工業社製の人尿由来hEPOを使用した。

【0060】

【実施例3 HuIFN- γ をコードするDNAを含む組換えDNAの調製】健常者から末梢血を採取し、常法にしたがってリンパ球を分離した。リンパ球を10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI 1640培

ブロープ1:

5' - TGGCTGTTACTGCCAGGACCCATAT - 3'

【0063】

【表15】

ブロープ2:

5' - AAACGAGATGACTTCGAAA - 3'

【0064】

【表16】

ブロープ3:

5' - CATGAAGTCATCCAAGTGA - 3'

【0065】その後、常法により、上記組換えDNAを制限酵素Xho I及びNot Iで消化し、消化物からHuIFN- γ をコードするcDNAを含むDNA断片を採取・精製し、実施例1-1で構築したプラスミドベクターpHIFP1のXho I-Not I認識部位間に挿入することにより、HuIFN- α プロモータの下流にHuIFN- γ をコードするcDNAが連結した組換えDNA『pIFPhIFG』を得た。

【0066】

【実施例4 HuIFN- γ をコードするDNAを含む形質転換体の調製】実施例3で得た組換えDNA『pIFPhIFG』を実施例2と同様、エレクトロポレーシ

地(pH7.2)に血球密度 2.5×10^6 個/mlになるように浮遊させ、レンチルレクチンを10 μ g/ml加えた後、5% CO₂ インキュベータ中、37℃で48時間インキュベートした。常法により、遠心分離により培養物から回収した血球からmRNAを採取・精製し、実施例1-2と同様にしてRT-PCR法によりHuIFN- γ をコードするcDNAを増幅し、実施例1-2と同様にしてプラスミドベクターpBluescript SK(-)に挿入して組換えDNAとなし、これを大腸菌HB101株に導入し、増殖させた。

【0061】別途、リック・デリンク等が『ヌクレイック・アシーズ・リサーチ』、第10巻、第3605～3615頁(1982年)に報告しているHuIFN- γ をコードするcDNAの塩基配列に基づき、下記の表14、表15又は表16に示す塩基配列のプロープ1、プロープ2及びプロープ3を化学合成し、常法により³²Pで標識した。これらプロープを使用し、ハイブリダイゼーション法により前記大腸菌からHuIFN- γ をコードするcDNAを含むクローンを選択し、常法により増殖させた後、組換えDNAを採取・精製した。組換えDNAの一部をとり、挿入したDNA断片の塩基配列をジデオキシ法により調べたところ、デリンク等が報告している塩基配列を含んでいた。

【0062】

【表14】

ョン法によりBALL-1細胞に導入した。形質転換体を10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH7.2)に浮遊させ、5% CO₂ インキュベータ中、37℃で72時間培養後、培養物から形質転換体を採取し、新鮮な同じ培養培地で洗浄した。次に、形質転換体をG-418を1 mg/ml含む10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH7.2)に細胞密度約 4×10^5 個/mlになるように浮遊させ、5% CO₂ インキュベータ中、37℃で約1カ月間培養後、生育細胞を採取クローン化した。

【0067】このようにして得た40種類の形質転換体につき、それぞれ別個に10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH7.2)に細胞密度約 4×10^5 個/mlになるように浮遊させ、培養培地にIFN- α (BALL-1) を100 IU/ml加え、37℃で15時間培養後、培養培地にセンダイウイルスを約50 HA/ml加え、同じ温度でさらに15時間培養した。培養物の抗ウイルス活性を調べたところ、発現効率が最も高い形質転換体『BIG-713』で、形質転換体 4×10^5 個当たり、約6,000 IUのHuIFN- γ 産生が認められた。対照として、同じ

形質転換体をセンダイウイルスの非存在下で同様に培養したところ、HuIFN- γ 産生は認められなかった。このことは、本件の形質転換体が、IFN- α 誘導剤による外部刺激により、その発現を人為的に制御可能であることを裏付けている。

【0068】なお、この発明を通じて、HuIFN- γ の活性は、モノクローナル抗HuIFN- α 抗体及びモノクローナル抗HuIFN- β 抗体の存在下、シンドビスウイルスによるヒト羊膜細胞FL株の変性を指標とする色素取り込み法により測定し、国際単位(IU)に較正して表示した。標準品には、アメリカ合衆国国立衛生研究所から入手したHuIFN- γ 標準品(NIH Ga23-901-530)を使用した。

【0069】以下、上記実施例で調製した形質転換体を使用するhEPOとHuIFN- γ の参考製造例について説明する。

【0070】

【参考例1 形質転換体によるhEPOの製造】10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.2)に実施例1-2で得た形質転換体BE-912を細胞密度約 5×10^4 個/mlになるように浮遊させ、5%CO₂インキュベータ中、37°Cで18時間培養した。遠心分離により培養物から採取した細胞を新鮮な同一培地で洗浄し、新鮮な同じ培養培地に細胞密度 5×10^4 個/mlになるように浮遊させ、IFN- α (BALL-1)を100IU/ml加え、5%CO₂インキュベータ中、37°Cで3時間インキュベートした後、ニューカッスル病ウイルスを50HA/ml加え、同じ温度でさらに18時間培養した。培養物のEPO活性を測定したところ、約400U/mlのhEPO産生が認められた。

【0071】その後、常法により、培養物から形質転換体を除去し、濃縮した後、培養物に含まれるhEPOをイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト・カラムクロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーにより比活性約 1×10^5 U/mg蛋白質にまで精製した。精製hEPOの一部をとり、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動後、ゲル上で過沃素酸シッフ試薬を作用させたところ、EPO活性を有するバンドが赤色に染色された。このことは、産生したhEPOに有意の糖鎖が結合していることを示している。

【0072】

【参考例2 形質転換体によるhEPOの製造】10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.2)に実施例1-2で得た形質転換体BE-912を細胞密度約 5×10^4 個/mlになるように浮遊させ、参考例1と同様にして増殖させた。次いで、形質転換体を生理食塩水に浮遊させ、常法により免疫抑制したハムスター新生児の大腿部皮下に約 1×10^4 個/匹の割合で注射移植し、その後、通常の方法によりハ

ムスターを4週間飼育した。常法により、皮下に生じた腫瘍塊(平均約15g/匹)を摘出し、分散させ、得られた細胞をRPMI1640培地(pH7.2)で洗浄した後、新鮮な同じ培養培地に細胞密度約 5×10^4 個/mlになるように浮遊させ、IFN- α (BALL-1)を100IU/ml加え、5%CO₂インキュベータ中、37°Cで3時間インキュベートした後、培養培地にセンダイウイルスを50HA/ml加え、同じ温度でさらに18時間インキュベートした。培養物のEPO活性を測定したところ、約600U/mlのhEPO産生が認められた。

【0073】

【参考例3 形質転換体によるHuIFN- γ の製造】

10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.2)に実施例4で得た形質転換体BIG-713を細胞密度約 4×10^4 個/mlになるように浮遊させ、5%CO₂インキュベータ中、37°Cで15時間培養して増殖させた。遠心分離により培養物から採取した細胞を生理食塩水で洗浄し、血清無含有のRPMI1640培地(pH7.2)に細胞密度約 5×10^4 個/mlになるように浮遊させ、培養培地にIFN- α (BALL-1)を100IU/ml加え、5%CO₂インキュベータ中、37°Cで3時間インキュベートした後、培養培地にセンダイウイルスを100HA/ml加え、同じ温度でさらに18時間インキュベートした。培養物の抗ウイルス活性を測定したところ、約80,000IU/mlのHuIFN- γ 産生が認められた。

【0074】その後、常法により、培養物から形質転換体を除去し、濃縮した後、培養物に含まれるHuIFN- γ を抗HuIFN- γ 抗体カラムクロマトグラフィーにより比活性約 1×10^4 IU/mg蛋白質にまで精製した。精製HuIFN- γ の一部をとり、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動後、ゲル上で過沃素酸シッフ試薬を作用させたところ、抗ウイルス活性を有するバンドが赤色に染色された。このことは、産生したHuIFN- γ に有意の糖鎖が結合していることを示している。

【0075】

【参考例4 形質転換体によるHuIFN- γ の製造】

10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.2)に実施例4で得た形質転換体BIG-713を細胞密度約 4×10^4 個/mlになるように浮遊させ、5%CO₂インキュベータ中、37°Cで15時間培養して増殖させた。遠心分離により培養物から採取した細胞を生理食塩水で洗浄後、血清無含有のRPMI1640培地(pH7.2)に浮遊させ、ヌードマウスの大腿部皮下に約 1×10^4 個/匹の割合で注射移植した。その後、ヌードマウスを通常一般の方法で5週間飼育し、皮下に生じた腫瘍塊(平均約12g/匹)

を抽出し、分散させた。

【0076】このようにして得た形質転換体をセンダイウイルスに代えてニューカッスル病ウイルスを使用した以外は参考例3と同様に処理したところ、約100,000IU/mlのHuIFN- γ が産生した。

【0077】

【発明の効果】叙上のとおり、この発明はIFN- α プロモータを利用する新規な組換えDNAと形質転換体を提供するものである。

【0078】この発明の組換えDNAを導入した形質転換体は、IFN- α 誘導剤による外部刺激の有無により、ポリペプチドの産生を人為的に制御することができる。これにより、この発明の形質転換体は、IFN- α 誘導剤の非存在下で培養することにより、自ら産生したポリペプチドにより障害を起こしたり、死滅することなく、最大限に増殖することができる。そして、増殖した形質転換体を適宜IFN- α 誘導剤の存在下で培養すれば、導入したDNAが最大限に発現して、所期のポリペプチドを産生する。斯くして、この発明によるときは、従来の組換えDNAや形質転換体では製造困難であったポリペプチドであっても、所望量を容易に製造できることとなる。

【0079】さらに、この発明は、IFN- α プロモータ自体が極めて強力なことに加えて、通常一般のIFN- α 誘導剤が医薬品の製造過程に支障なく使用でき、しかも、それらはポリペプチドの精製過程で容易に除去できることから、安全なポリペプチドを効率的に所望量を製造できる特徴がある。殊に、目的とするポリペプチド

が、元来、糖鎖が付加した形態で産生されるものである場合には、従来の組換えDNA技術では容易に得られない、顕著な薬効のポリペプチドを容易に製造できることとなる。そして、HuIFN- α プロモータを使用する形質転換体が産生するポリペプチドは、HuIFN- α プロモータが、本来、ヒトの体内に存在するものであることから、ヒトに投与することを前提とする医薬品に副作用等の懸念なく安全に配合使用できる。

【0080】この発明は斯くも顕著な作用効果を発揮する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な、意義のある発明といえる。

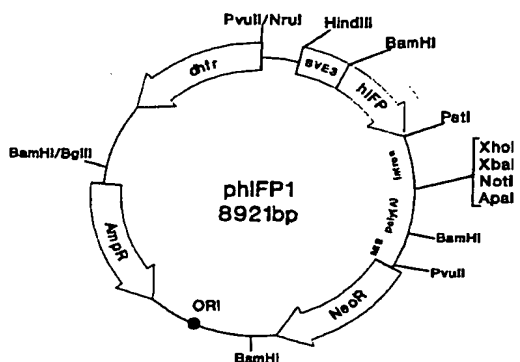
【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドベクターphIFP1の構造を示す図である。

【符号の説明】

hIFP	HuIFN- α 2プロモータ
poly(A)	SV40のポリアダリ化シグナル遺伝子
M13	M13ファージの複製開始点
Neor	ネオマイシン・アミノグリコシド・フォスフォトランスフェラーゼ遺伝子
ORI	大腸菌の複製開始点
AmpR	β -ラクタマーゼ遺伝子
dhfr	ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子
SVE3	SVEが3個直列に連結した遺伝子

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成6年7月14日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】この発明で用いるプラスミドベクターは、組換えDNAや形質転換体をクローニングするための適宜薬剤耐性遺伝子や、形質転換体の発現効率を高めるための適宜エンハンサーの挿入を妨げない。個々の薬剤耐性遺伝子としては、例えば、蛋白質合成阻害剤の一種であるG-418への耐性を与えるネオマイシン・アミノグリコシド・フォスホトランスフェラーゼ遺伝子（以下、「Neor遺伝子」と略記する。）、核酸合成阻害剤の一種であるメトトレキサートへの耐性を与えるジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子（以下、「dhfr遺伝子」と略記する。）、アンピシリンへの耐性を与えるβ-ラクタマーゼ遺伝子（以下、「AmpR」と略記する。）などが挙げられる。エンハンサーにはSV40エンハンサー（以下、「SVE」と略記する。）が好適であり、後記プラスミドベクターpHIFP1はこれら薬剤耐性形質やエンハンサーをすべて具備しており、この発明を実施するうえで極めて有用である。なお、プラスミドベクターの適所に開始コドンや終止コドンを適宜挿入し得ることは言うまでもない。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正内容】

【0017】次に、プラスミドベクターに挿入されるIFN-α以外のポリペプチドをコードするDNAについて説明するに、この発明でいうポリペプチドとはIFN-α以外のポリペプチド一般を意味し、分子中における糖鎖の有無がその生物作用や副作用に実質的な影響をもたらすものも対象となり得る。個々のポリペプチドとしては、IFN-β、IFN-γ、腫瘍壊死因子、マクロファージ遊走阻止因子、マクロファージ活性化因子、マクロファージ走化性因子、コロニー形成因子、幼若化因子、インターロイキン2、インターロイキン3、好中球走化性因子及び白血球遊走阻止因子などのサイトカイン、エリスロポエチン、インシュリン、ソマトスタチン、成長ホルモンなどのペプチドホルモン、さらには、組織プラスミノゲン・アクチベータなどの酵素がその対象となる。このうちの多くのポリペプチドは、本来、糖鎖を結合した形態で産生されており、その一部においては、糖鎖の有無がその生物作用や副作用に実質的な影響を及ぼすことが知られている。この発明の形質転換体が産生するHuINF-γ、腫瘍壊死因子、ヒトエリス

ロポエチン（以下、「hEPO」と略記する。）などには有意の糖鎖が結合しており、医薬品に配合してヒトに投与すると、重篤な副作用を惹起することなく顕著な治療・予防効果を発揮する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正内容】

【0023】産生したポリペプチドは、斯界における通常一般の方法で精製することができる。例えば、遠心分離により培養物から形質転換体を除去して得られる培養上清に硫酸アンモニウムを加えて塩析し、得られる粗ポリペプチドを含む沈殿物を、例えば、濃縮、塩析、透析、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動、アフィニティークロマトグラフィーなどの精製方法を適宜組合せて精製すればよい。ポリペプチドがIFNや腫瘍壊死因子の場合には、モノクローナル抗体をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーが有用であり、最高純度のポリペプチドを最少限の労力とコストで得ることができる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】別途、常法により、化2に示すhIFP遺伝子を含む塩基配列の下記表1又は表2に示すプライマー1及びプライマー2を化学合成し、これらプライマーの存在下で精製ゲノムDNAをPCR法により遺伝子増幅することにより、hIFP領域を含む約500塩基対からなるDNA断片を得た。常法により、このDNA断片にT4 DNAポリメラーゼを作用させて両末端を平滑化した後、T4 DNAリガーゼにより、予め制限酵素HincIIで処理しておいたプラスミドベクターpUC18（ATCC 37253）に挿入した。得られた組換えDNAをコンピテントセル法により大腸菌HB101株（ATCC 33694）に導入し、その後、大腸菌をアンピシリン100μg/mlを含むLB培地（pH7.2）に植菌し、37℃で18時間培養後、培養物を遠心分離して菌体を採取し、通常一般の方法により組換えDNAを抽出した。組換えDNAの一部を取り、挿入されたDNA断片の塩基配列をジデオキシ法により調べたところ、化2に示す塩基配列を含んでいた。その後、組換えDNAを制限酵素BamHI及びPstIで消化し、精製することにより、hIFP領域を含む508個の塩基対からなるBamHI-PstI DNA断片を得た。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正内容】

【0032】

【実施例1-1 (b) ヒトβ-グロビンイントロン領域を含むDNA断片の調製】エル・エス・セイン等が『プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エー』、第87巻、第3924~3928頁(1990年)に報告しているヒトβ-グロビンイントロンの塩基配列に基づき、そのB領域を挟みこむ下記の表3又は表4に示す塩基配列のプライマー3及びプライマー4を化学合成した。次いで、実施例1-1 (a) で得たBAL-1細胞由来の精製ゲノムDNAの一部をとり、これをプライマー3及びプライマー4を用いた以外は実施例1-1 (a) と同様に遺伝子増幅してヒトβ-グロビンイントロン領域を含む約850塩基対のDNA断片を得た。常法により、DNA断片の両末端をT4 DNAポリメラーゼで平滑化した後、T4 DNAリガーゼにより、予め制限

BglIIリンカー:



【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正内容】

【0046】別途、常法により、HCMV AD-169株(ATCC VR-807)のDNAを採取・精製し、プライマー5及びプライマー6の存在下でPCR法により遺伝子増幅し、得られた約280塩基対からなるDNA断片の両末端をT4 DNAポリメラーゼで平滑化した後、T4 DNAリガーゼにより、予め制限酵素HincIIで切断しておいたプラスミドベクターpUC18(ATCC 37253)に挿入した。得られた組換えDNAを実施例1-1 (a) と同様にして大腸菌HB101株に導入し、増殖させた後、採取・精製し、制限酵素NruI及びNdeIで消化し、精製することにより、HCMV遺伝子を含む277塩基対からなるNruI-NdeI DNA断片を得た。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0066

【補正方法】変更

【補正内容】

【0066】

酵素HincIIで切断しておいたストラタジーン・クローニング・システムズ製プラスミドベクター『pBluescript SK(-)』に挿入して組換えDNAとなし、これを実施例1-1 (a) と同様にして大腸菌HB101株に導入し、増殖させた後、分離・精製した。組換えDNAの一部をとり、挿入したDNA断片の塩基配列をジデオキシ法により分析したところ、セイン等が報告している塩基配列を含んでいた。その後、組換えDNAを制限酵素PstI及びXhoIで消化し、精製することにより、ヒトβ-グロビンイントロン領域を含む840塩基対からなるPstI-XhoI DNA断片を得た。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正内容】

【0036】

【表5】

【実施例4 HuIFN-γをコードするDNAを含む形質転換体の調製】実施例3で得た組換えDNA『pIFPhIFG』を実施例2と同様、エレクトロポレーション法によりBAL-1細胞に導入した。形質転換体を10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.2)に浮遊させ、5%CO₂インキュベータ中、37℃で72時間培養後、培養物から形質転換体を採取し、新鮮な同じ培養培地で洗浄した。次に、形質転換体をG-418を1mg/ml含む10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.2)に細胞密度約4×10⁵個/mlになるように浮遊させ、5%CO₂インキュベータ中、37℃で約1カ月間培養後、生育細胞を採取し、クローン化した。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0067

【補正方法】変更

【補正内容】

【0067】このようにして得た40種類の形質転換体につき、それぞれ別個に10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.2)に細胞密度約4×10⁵個/mlになるように浮遊させ、培養培地にIFN-α (BAL-1) をそれぞれ100I

U/ml 加え、37℃で15時間培養後、培養培地にセ
ンダイウイルスを約50HA/ml 加え、同じ温度でさ
らに15時間培養した。培養物の抗ウイルス活性を調べ
たところ、発現効率が最も高い形質転換体『BIG-7
13』で、形質転換体 4×10^5 個当たり、約6,000IUのHuIFN- γ 産生が認められた。対照とし

て、同じ形質転換体をセンドイウイルスの非存在下で同
様に培養したところ、HuIFN- γ 産生は認められな
かった。このことは、本例の形質転換体が、IFN- α
誘導剤による外部刺激により、その発現を人為的に制御
可能であることを裏付けている。